



Title	新規口腔がん治療法開発のための個体解析基盤の創出 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	木村, 拓
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15501号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89637
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Taku_Kimura_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 木村 拓

学位論文題名
新規口腔がん治療法開発のための個体解析基盤の創出

キーワード（5つ）口腔がん, ショウジョウバエ, 遺伝学, 新規モデル動物, 3D 培養細胞

口腔がんは頭頸部がんの約半分を占めるがん種で、約 90%が扁平上皮がん [Oral squamous cell carcinoma (OSCC)] である。我が国における OSCC の罹患者数はがん全体の 11 位だが、その患者数は世界的に増加傾向にある。OSCC 患者に対する現在の標準治療では、外科的切除に補助療法として化学療法や放射線治療を組み合わせた集学的治療を実施する。しかしこれら従来の治療を実施しても、多くの患者に薬剤耐性や副作用が発現するため、治療を完遂することは困難である。そのため、現在の標準治療と比較してより有効性が高くかつ副作用の小さい新規治療法の開発が喫緊の課題となっている。

この課題を解決すべく、これまでヒト口腔がん細胞株やモデルマウスを使用した OSCC の新規治療法開発が進められてきたが、OSCC の遺伝子変異は多様で、発がんを促進する明確なドライバー遺伝子が同定されていない。このため、OSCC 発症機序の全貌の解明や新規治療標的の網羅的な同定、そして新規治療法の効率的な創出を実現する目処は立っていない。

そこで本研究で申請者は、新規口腔がん治療法の効率的な創出を目指し、OSCC 患者の遺伝子型を模倣した新規モデルショウジョウバエの作成やこれを含む複数の口腔がんモデルの使用、そして異分野融合を特徴とする独自の研究基盤を構築する。申請者の所属研究室は、従来の培養ヒトがん細胞株やモデルマウスにハエを相補的に組み合わせ、多様ながんの発生素過程の解明や新規治療薬の開発を効率的に推進してきた。例えばこれまでに所属研究室は、甲状腺がんや膵がん等多様ながんの遺伝子型を模倣した新規モデルハエを作出してきた。そしてこれを活用し、個体レベルかつ網羅的な遺伝学的スクリーニングや化合物スクリーニングを実施することで、これらのがんの病態解明や新規治療法開発に貢献してきた。

本研究で申請者はこの基盤を応用し、予後不良な HPV 陰性 OSCC 患者の遺伝子型を模倣したモデルハエの創出に取り組んだ。申請者の所属研究室は、酵母由来の *GAL4-UAS* 転写制御系を利用して、幼虫の任意の組織や細胞種に外来遺伝子を発現する系を確立している。そこで申請者はこれを活用し、①翅原基の扁平上皮細胞で転写因子 *GAL4* を発現するドライバーハエの同定と、②*GAL4* が結合して転写を活性化する *UAS* 配列の下流に OSCC で観察されるミスセンス変異型や野生型の cDNA 配列を配置した *UAS* ハエ群の作出に取り組んだ。

①で申請者はまず、扁平上皮細胞に活性を示すドライバーハエを同定すべく、当該細胞で活性を示すことが示唆されている計 11 系統のドライバーハエの遺伝学スクリーニングを実施した。すなわち申請者は、これらの系統をそれぞれ *UAS-GFP* ハエと交配し、*GFP* の発現を指標にして、翅原基の扁平上皮細胞で安定的に外来遺伝子を発現するドライバーハエの同定を行った。その結果申請者は、この能力を有する *Ultrabithorax-GAL4*、*Grunge-GAL4*、*teashirt-GAL4* の 3 種のドライバーハエを同定することに成功した。

次に②で申請者は、がんゲノムデータベース cBioPortal から、HPV 陰性 OSCC 患者において *TP53* (ミスセンス変異: R248Q あるいは R248W)、*PIK3CA* (ミスセンス変異: E545K)、*CDKN2A* (機能欠失変異) の変異および *EGFR* の過剰発現が高頻度に観察されることを見出した。さらに申請者は、先行研究を参照もしくはオルソログ検索データベース DIOPT を使用し、これら 4 つのヒト遺伝子のうちハエ遺伝子の *p53* (ミスセンス変異: R234Q、R234W)、*Pi3k92E* (ミスセンス変異: D572K) および *Egfr* は構造的に相同であることを見出した。一方 *CDKN2A* は、機能的に相同なハエ遺伝子が存在しないため、申請者は *CycE* の過剰発現により *CDKN2A* の機能欠失変異を模倣した。

そして申請者は、幼虫のゲノム DNA からこれら 4 つのハエ遺伝子のミスセンス変異型や野生型の cDNA を PCR により増幅し単離し、ライゲーション反応を実施して外来遺伝子導入用ベクターへ搭載した。その後申請者は、各ベクター DNA のハエ受精卵への顕微注入を通じ、OSCC の遺伝子変異を導入した *UAS* ハエ群を作出した。

そして、導入した各遺伝子がハエ組織中で期待する機能を有しているか検証すべく、申請者はこの *UAS* ハエ群を使用し、先行研究で多用される複眼や翅原基をモデル組織とする表現型解析を実施した。その結果申請者は、これら 4 遺伝子のミスセンス変異型や野生型をモデル組織に発現すると、これらの組織が先行研究と類似した表現型を示すことを見出した。この結果から申請者は、これら 4 遺伝子は期待する機能を有していることを確認した。

各 4 遺伝子の機能解析後申請者は、上記の *UAS* ハエ同士を交配することで、遺伝子変異の多様な組み合わせを有する *UAS* ハエを計 8 系統作出した。さらに申請者は、扁平上皮細胞特異的に活性を示す *Ultrabithorax-GAL4* ドライバーハエとこれらの *UAS* ハエ群を交配することで、口腔がん遺伝子型モデルハエを作出した。そこで申請者は、これらの遺伝子型モデルハエの表現型を解析するために、まず各系統の個体生存率を解析した。その結果申請者は、*Ubx>GFP,p53^{R234Q},CycE,Pi3K92E^{D572K}* ハエが最も低い生存率を示すことを見出した。こ

の結果は、ヒト口腔がんの遺伝子型をハエ扁平上皮細胞で模倣することでこの細胞で形質転換が生じ、個体生存率が低下したことを示唆している。

次に申請者は、*patched>GFP* ドライバーハエを用いて、扁平上皮細胞における表現型を解析した。すると、変異遺伝子をより多く導入されている系統の方が、扁平上皮細胞の翅原基全体に占める割合は高かった。この結果は、扁平上皮細胞において発現する変異遺伝子の数の増大に伴い、扁平上皮細胞の形質転換が亢進したことを示唆している。

申請者は今後、口腔がん遺伝子型モデルハエを使用して、網羅的薬物スクリーニングを実施し新規口腔がん治療薬候補を個体レベルで同定することを目指している。申請者はこれらの候補が口腔がん細胞に与える影響を検証する実験系を構築すべく、ヒト口腔がん細胞株の HSC-3、HSC-4 と SAS を使用し、Spheroid forming assay および Soft agar assay の2種の三次元培養を実施した。その結果申請者は、SAS のみがスフェロイドおよびコロニー形成能を有することを見出した。申請者は今後、これらの細胞を活用した異種移植モデルマウスの樹立に取り組み、治療薬候補やがん発生機序の解析にこれらのマウスを援用する予定である。

以上のようにハエの実験系を従来のがん創薬研究基盤に組み込むことで、申請者は OSCC の新規治療薬の開発を加速することが可能となると考える。

申請者は、今後も本研究に継続して取り組むことで新規口腔がん治療法を創出し、福祉向上への貢献を目指す。